REALE ACCADEMIA DEI LINCEI
Comunicazioni pervenute all'Accademia durante le ferie del 1913.
Estratto dal vol. XXII, serie 5ª, 2° sem., fasc. 4°. – Agosto 1913.

9.



Chimica-fisica. — *Proprietà colloidali dell'emoglobina* (1). Nota del Corrisp. FILIPPO BOTTAZZI (2).

Sebbene non manchino osservazioni sparse e occasionali, non esiste tuttavia uno studio sistematico sulle proprietà colloidali dell'emoglobina, che, pur essendo la sostanza proteica più facilmente cristallizzabile, non cessa d'essere un colloide, come le altre proteine semplici o coniugate.

Sapendo che i cristalli di ossiemoglobina sono sempre inquinati, fra l'altro, da proteine del sangue, cioè da altri colloidi, ho preparato l'emoglobina pura, non per cristallizzazione, ma per dialisi.

Centrifugato il sangue defibrinato, ho lavato dieci volte la poltiglia corpuscolare con soluzione 1 °/₀ di cloruro sodico, rimescolando, centrifugando e decantando il liquido ogni volta: così ho sbarazzato del siero i corpuscoli rossi. Ho sciolto la poltiglia corpuscolare in acqua distillata, e dalla soluzione ho precipitato la materia stromica sia mediante soluzione 2 °/₀ di $KHSO_4$, sia mediante dialisi di pochi giorni. La soluzione di ossiemoglobina così ottenuta, molto concentrata, è stata dializzata fortemente (in budelli di pergamena artificiale, entro grandi vasi chiusi con tappo smerigliato, in ambiente saturo di toluolo), cambiando l'acqua distillata ogni giorno, per quattro mesi e più.

(1) Lavoro eseguito nell'Istituto di Fisiologia sperimentale della R. Università di Napoli.

(2) Pervenuta all'Accademia il 23 luglio 1913.

Fra i tre e i quattro mesi di dialisi, la soluzione di emoglobina, così preparata, aveva in media:

peso specifico	1,004
residuo secco	1,08 %
contenuto in ceneri	0,011 %
conduttività elettrica $K_{20^\circ c}$ =	1×10^{-4}.

Durante la dialisi, la soluzione di emoglobina, dopo che ha cessato di aumentare di volume per attrazione d'acqua dall'esterno, continua a diluirsi, perchè l'emoglobina, man mano che la dialisi procede, precipita. In capo a cinque mesi e mezzo di dialisi, posso dire che, praticamente, tutta l'emoglobina è precipitata.

Il precipitato rosso resulta, al microscopio, di granellini isolati, di color giallo-rossastro, fortemente rifrangenti la luce, dotati di vivace moto browniano, nei quali è impossibile, data la loro piccolezza, distinguere una netta forma cristallina, ma che tuttavia non sembrano essere globosi o amorfi, come i granuli di precipitazione delle altre proteine.

Durante la dialisi, la soluzione di emoglobina, esaminata all'ultramicroscopio, presenta sempre un considerevole numero di granuli brillanti su fondo rosso cupo. Ma se la si filtra più volte attraverso uno strato di precipitato della stessa emoglobina e per carta spessa in più doppî, si finisce per avere un filtrato che, all'ultramicroscopio, otticamente apparisce affatto omogeneo. Basta però rimettere a dializzare questo liquido, o anche abbandonarlo a sè stesso (sotto toluolo) in un recipiente, perchè esso diventi presto granuloso, per formazione di granuli, prima visibili solo all'ultramicroscopio, poi al microscopio e, finalmente, anche a occhio nudo. L'emogloblina, dunque, dà in acqua una soluzione vera, otticamente vuota; soluzione, però, instabile, se è dializzata. Per rendere stabilissima l'emoglobina, basta aggiungere una traccia di alcali o di acido: sparisce ogni granulo, e la soluzione diventa perfettamente omogenea.

Durante la dialisi, l'ossiemoglobina si è trasformata quasi tutta (95 %, come resulta dalle seguenti determinazioni spettrofotometriche:

coefficiente d'estinzione in corrispondenza di $\lambda = 537\ \mu\mu$ $\varepsilon' = 0,4142$
» » » $\lambda = 559,5\ \mu\mu$ $\varepsilon = 0,3423$

$$\text{quoziente di assorbimento } \frac{\varepsilon'}{\varepsilon} = 1,205$$

e dalla tabella di Hüfner) in metemoglobina, con le caratteristiche strie di assorbimento di essa (metemoglobina alcalina). La soluzione in minima quantità di alcali di emoglobina precipitata per dialisi, presenta lo spettro caratteristico della metemoglobina alcalina.

L'emoglobina precipitata per lunga e intensa dialisi è praticamente insolubile in sali neutri, solubilissima in acidi e in alcali. Sciolta in una data quantità di alcali, se cautamente si neutralizza questo con una equivalente quantità di acido, l'emoglobina precipita totalmente; precipita anche se la si scioglie in acido, e poi si neutralizza questo con una equivalente quantità di alcali. Sciolta in soluzione 0,1 *n* HCl (per esempio), è rapidamente e totalmente precipitata dal Na Cl in piccola quantità. Le soluzioni alcaline sono più resistenti all'azione precipitante dei sali neutri. Un eccesso di acido o di alcali le stabilizza e le mette al riparo dell'azione precipitante dei sali neutri.

La metemoglobina perfettamente dializzata coagula a 47°-53° C.; imperfettamente dializzata, o in presenza di traccie di alcali, la soluzione diventa a quelle temperature opalescente e torbida, ma non fiocchifica; fiocchifica, se vi si aggiunge una piccola quantità d'un sale neutro.

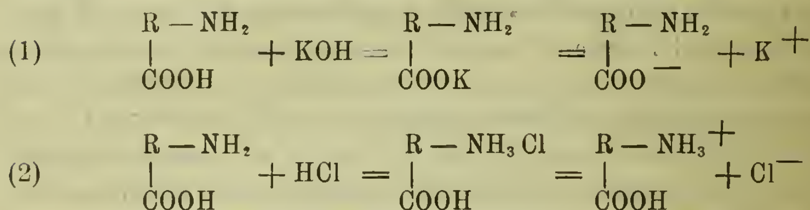
In presenza d'un piccolo eccesso di alcali o di acido, e in assenza di sali neutri, l'emoglobina non è coagulata dal calore. Il coagulo di emoglobina ottenuto a 55° o a 100° C., è solubile in alcali o acidi; questa soluzione non presenta più l'identico spettro della metemoglobina, ma nemmeno quello dell'ematina, o dell'emocromogeno o dell'ematoporfirina; presenta uno spettro speciale, con tre bande d'assorbimento assai diffuse, una fra C e D piuttosto larga, e due fra D ed E. Il calore, quindi, non scompone profondamente (cioè in globina ed ematina) la metemoglobina.

Esposta all'azione di un campo elettrico, la metemoglobina pura ancòra sciolta (o quella precipitata, sciolta nella minima quantità di alcali sufficiente) precipita all'anodo (coagulazione elettrica) e migra dal catodo verso l'anodo: essa è dunque un colloide elettronegativo (contrariamente alle affermazioni di Gamgee e di V. Henri). Se invece è trattata con una minima quantità di acido, l'emoglobina migra dall'anodo verso il catodo, dove coagula: essa diventa un colloide elettropositivo.

Il coagulo, insolubile in acqua o in sali neutri, è solubile in alcali o in acidi, e le soluzioni presentano lo spettro della metemoglobina. Il trasporto elettrico dell'emoglobina pura (dializzata per molto tempo) non differisce, dunque, da quello delle altre proteine anche purificate per dialisi; il che vuol dire che in questa, come nelle altre proprietà colloidali che l'emoglobina presenta, predomina sempre il suo componente proteico sul componente prostetico.

La conduttività elettrica delle soluzioni di emoglobina, per quanto dializzate, è notevolmente grande: assai maggiore, per es., di quella di una soluzione egualmente concentrata di gelatina, sebbene dializzata per un tempo assai minore. Ciò fa supporre che, finchè si trova sciolta sebbene in un periodo avanzato di dialisi, l'emoglobina costituisce un sale alcalino, per es. un *emoglobinato di potassio*, notevolmente dissociabile, i cui ioni elettronegativi

(emoglobinioni) presentano, naturalmente, migrazione anodica. Ma la dialisi troppo intensificata e prolungata gli sottrae il poco alcali necessario perchè rimanga in soluzione, e allora l'*acido emoglobinico*, pochissimo dissociabile, precipita. La sostanza che precipita, e il sale che essa forma con alcali o con acidi, possiamo rappresentare con le note formule schematiche dei gruppi estremi degli aminoacidi costitutivi della molecola proteica:



$$(1)\quad \begin{array}{l} R-NH_2 \\ | \\ COOH \end{array} + KOH = \begin{array}{l} R-NH_2 \\ | \\ COOK \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{l} R-NH_2 \\ | \\ COO^- \end{array} + K^+$$

$$(2)\quad \begin{array}{l} R-NH_2 \\ | \\ COOH \end{array} + HCl = \begin{array}{l} R-NH_3Cl \\ | \\ COOH \end{array} = \begin{array}{l} R-NH_3^+ \\ | \\ COOH \end{array} + Cl^-$$

L'emoglobinato alcalino, però, sembra essere più solubile e dissociabile che non il cloruro di emoglobina. Verosimilmente, allo stato di sale alcalino si trova l'emoglobina in condizioni naturali; e alla sua solubilità contribuisce la reazione debolmente alcalina dei liquidi dell'organismo.

Il punto di coagulazione, straordinariamente basso, della metemoglobina dializzata, fa supporre che, durante la trasformazione dell'ossiemoglobina (che coagula a circa 68° C.) in metaemoglobina (che coagula a temperatura tanto più bassa, anche se in altro modo ottenuta), questa cromoproteina subisca un processo di polimerizzazione o condensazione, per disidratazione, che la fa divenire tanto termolabile. Bisogna notare, per altro, che essa è già metemoglobina, prima di precipitare; onde si deve ammettere che la condensazione sia effetto di disimbibizione delle micelle colloidali, causata dalla progressiva sottrazione (per dialisi) dell'alcali.

In un'altra Nota di prossima pubblicazione renderò conto delle ricerche di viscosità e di tensione superficiale che ho fatte sopra sospensioni e soluzioni della stessa metemoglobina pura.